

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-277143

(43)Date of publication of application : 20.10.1998

(51)Int.Cl.

A61L 27/00
A61F 2/10
C12N 5/06
//(C12N 5/06
C12R 1:91)

(21)Application number : 09-104022

(71)Applicant : TOKAI UNIV

(22)Date of filing : 08.04.1997

(72)Inventor : INOUCHI SADAKI

(54) TRANSPLANT AND MANUFACTURE OF THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the take rate in the transplantation, reproduce the skin or the like, and permanently close a wound, by embedding the fibroblast derived from an epithelium tissue, in a sheet of agglutination human plasma proteins or agglutination human fibrin, and attaching squamous epithelium cells to a surface of the sheet.

SOLUTION: The fibroblast exists in a condition that it is dispersed in a gel sheet made of fibrin or agglutination human plasma proteins, and a surface of the sheet is covered with the squamous epithelium cells, to obtain the transplantation piece. That is, the dermis fibroblast is suspended in a solution containing fibrinogen or the like, and is expanded in an incubator. Then thrombin and calcium are added to the same, to gglutinate fibrinogen, whereby the fibrin sheet in which the fibroblast is embedded, can be obtained. Then the low calcium serum-free medium or the like is added to the incubator, is left as it is for several hours, and the moisture is substituted for the culture medium. Then the human epidermis cell is sowed on the surface, to attach the cell. Whereby the transplantation piece of a high take property, can be obtained.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 14.01.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3333108

[Date of registration] 26.07.2002

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-277143

(43)公開日 平成10年(1998)10月20日

(51)Int.Cl.⁶
A 6 1 L 27/00
A 6 1 F 2/10
C 1 2 N 5/06
// (C 1 2 N 5/06
C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

A 6 1 L 27/00
A 6 1 F 2/10
C 1 2 N 5/00

C

E

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 12 頁)

(21)出願番号 特願平9-104022

(22)出願日 平成9年(1997)4月8日

特許法第30条第1項適用申請有り 1997年2月1日 社
団法人日本外科学会発行の「日本外科学会雑誌 第98巻
第2号」に発表

(71)出願人 000125369

学校法人東海大学

東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番4号

(72)発明者 猪口 貞樹

東京都世田谷区瀬田2-32-20-201

(74)代理人 弁理士 三好 秀和 (外1名)

(54)【発明の名称】 移植片およびその製造方法

(57)【要約】

【課題】 皮膚全層が欠損した創あるいは生体内の扁平
上皮組織の創など体表面の創に移植した場合に、優れた
生着率で皮膚やその他の扁平上皮組織を再現し、創を永
久閉鎖することができる移植片およびそれらの作製方法
を提供すること。

【解決手段】 本発明の移植片は、上皮性組織由来の線
維芽細胞が凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリン
のシート内に包埋され、当該上皮性組織由来の扁平上皮
細胞が前記シート表面上に付着されたことを特徴とす
る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 上皮性組織由来の線維芽細胞が凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンのシート内に包埋され、当該上皮性組織由来の扁平上皮細胞が前記シート表面上に付着された移植片。

【請求項2】 ヒトの真皮組織由来の線維芽細胞が凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンのシート内に包埋され、表皮細胞が前記シート表面上に付着された移植片。

【請求項3】 さらに、前記凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンのシート中にタンパク分解酵素抑制物質を含む請求項1または2に記載の移植片。

【請求項4】 上皮性組織から扁平上皮細胞ならびに線維芽細胞とを単離し、扁平上皮細胞と扁平上皮細胞を単離した上皮性組織と同一組織由来の線維芽細胞とをそれぞれ準備する段階と、得られた前記扁平上皮細胞と前記線維芽細胞とをそれぞれ増殖培養する段階と、増殖培養された線維芽細胞を凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンに包埋する段階と、得られた線維芽細胞を包埋した凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンの表面に扁平上皮細胞を付着させる段階とを備える移植片の製造方法。

【請求項5】 皮膚組織から表皮細胞ならびに線維芽細胞とを単離し、表皮細胞と真皮由来の線維芽細胞とをそれぞれ準備する段階と、得られた前記表皮細胞と前記線維芽細胞とをそれぞれ増殖培養する段階と、増殖培養された線維芽細胞を凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンに包埋する段階と、得られた線維芽細胞を包埋した凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンの表面に表皮細胞を付着させる段階とを備える移植片の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は移植片に関し、特に、ヒト皮膚あるいはその他の扁平上皮組織の全層欠損創を治療するために用いる移植片およびその製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 重症熱傷や外科手術などにおいて、しばしば広範囲の皮膚あるいはその他の扁平上皮組織の全層欠損創が生じる。これらの創は当該組織の成分をすべて失っているため、全層に至らない創のように自然の再生治癒を期待することはできず、治療のためには当該組織の移植が必要である。このような当該組織の移植に対して、例えば皮膚の構成細胞である表皮細胞、線維芽細胞は、生体外において $10^3 \sim 10^6$ 倍に増殖培養することが可能であるため、少量の皮膚を採取し、これを増殖培養してから創部へ移植する治療法が報告されている。

【0003】 これらの治療に用いられる移植法としては、大きく分けて増殖培養した表皮細胞のみを移植する

「表皮細胞単独移植法」と、線維芽細胞を含むコラーゲンゲルなどからなる真皮代替物上に表皮細胞を増殖培養して作製した線維芽細胞と表皮細胞との両者を含む、皮膚に類似の構造物を移植する「複合人工皮膚移植法」とが知られている。

【0004】 表皮細胞単独移植法には、表皮細胞のみを増殖培養し、さらにこれを重層化せしめて表皮細胞のシートを作製して移植する方法やコラーゲン、フィブリンなどをキャリアとして用い、培養した表皮細胞を単離状態で移植する方法などがあり、例えば、特公昭57-18863号公報には、ケラチノサイト（表皮細胞）を、増殖しないように放射線処理した3T3細胞と混合して培養する表皮細胞の増殖培養法が開示されており、特公平02-23191号公報には、このようにして得られた培養容器上の表皮細胞培養物を酵素処理して、移植用のシートを作製する方法が、また、特開平02-174848号公報には、コラーゲンを被覆した培養容器で表皮細胞をEGFとともに培養する方法が、さらに、特開平04-45785号公報には凝集したヒト血漿蛋白を支持体とした表皮細胞の培養法が開示されている。

【0005】 一方、複合人工皮膚移植法は、コラーゲンゲルやコラーゲンスポンジなどに培養した線維芽細胞を分散し、さらにこれらの表面に表皮細胞を培養、重層させて皮膚に類似の構造物を作製してから移植する方法であり、例えば、特公昭61-33593、特公平05-53505、特開平04-129563、特開平06-292568号公報をはじめ多数の文献が知られている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 しかしながら、上記の表皮細胞単独移植法は、真皮成分を欠く皮膚全層欠損創に直接移植した場合には生着性が低く、また長期間の生着も困難であり、広範囲の皮膚全層欠損創にそのまま適応するのは難しかった。従って、全層欠損創に対しては、コラーゲンゲルなどに線維芽細胞が分散されている真皮様構造を有する、皮膚に類似の構造物を移植する複合人工皮膚移植法が好ましいことになる。しかし、この移植法では、線維芽細胞を分散するコラーゲンなどの物質が表皮下へ移植される結果となり、この物質に対する免疫反応、易感染性などのために、やはり低い生着率しか報告されていなかった。以上のように、皮膚全層が欠損した体表面の創に増殖培養した皮膚細胞よりなる移植片を移植して創を永久閉鎖することは事実上困難であった。

【0007】 従って、本発明は皮膚全層が欠損した創あるいは生体内の扁平上皮組織の創など体表面の創に移植した場合に、優れた生着率で皮膚やその他の扁平上皮組織を再現し、創を永久閉鎖することができる移植片およびそれらの作製方法を提供することを課題とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者は単離した状態にあるヒト皮膚あるいはその他の扁平上皮組織の細胞を、体表面の全層欠損創に移植し、広い面積のヒト皮膚あるいはその他の扁平上皮組織を再現する方法について鋭意検討した結果、増殖培養したヒト表皮細胞あるいはその他の扁平上皮細胞をヒト真皮あるいは当該臓器由来線維芽細胞が包埋された凝集ヒト血漿蛋白もしくは凝集ヒトフィブリン表面に付着させた移植片を用いることによって生体表面に広い面積を持つ皮膚あるいはその他の扁平上皮組織を再現せしめ、体表面の創を永久閉鎖できることを見だし、本発明を完成した。

【0009】すなわち、本発明の移植片は、上皮性組織由来の線維芽細胞が凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンのシート内に包埋され、当該上皮性組織由来の扁平上皮細胞が前記シート表面上に付着されたことを特徴とし、また、ヒトの真皮組織由来の線維芽細胞が凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンのシート内に包埋され、表皮細胞が前記シート表面上に付着されたことを特徴とする。

【0010】また、本発明の移植片の作製方法は、上皮性組織から扁平上皮細胞ならびに線維芽細胞とを単離し、扁平上皮細胞と扁平上皮細胞を単離した上皮性組織と同一組織由来の線維芽細胞とをそれぞれ準備する段階と、得られた前記扁平上皮細胞と前記線維芽細胞とをそれぞれ増殖培養する段階と、増殖培養された線維芽細胞を凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンに包埋する段階と、得られた線維芽細胞を包埋した凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンの表面に扁平上皮細胞を付着させる段階との各段階を備えるもので、さらに、皮膚組織から表皮細胞ならびに線維芽細胞とを単離し、表皮細胞と真皮由来の線維芽細胞とをそれぞれ準備する段階と、得られた前記表皮細胞と前記線維芽細胞とをそれぞれ増殖培養する段階と、増殖培養された線維芽細胞を凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンに包埋する段階と、得られた線維芽細胞を包埋した凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンの表面に表皮細胞を付着させる段階との各段階を備えることを特徴とする。

【0011】本発明の移植片およびその製造方法は、すべての哺乳動物に対して適用することができるが、臨床的にも最も重要であるヒトに対する移植片の場合を例として、以下、詳細に説明する。

【0012】本発明の対象となる上皮性組織は、いずれも扁平上皮細胞を含む組織であり、種々の正常組織のすべてが含まれるが、これらの組織の例としては、例えば、皮膚、口腔粘膜、食道、舌などがあげられる。また、本発明に用いるヒトの細胞には、正常組織から得られる細胞の他、正常組織由来の細胞に対し、試験管内（インビトロ）において外来遺伝子の導入あるいは薬物による処置などを行いその性質を変化せしめた細胞も使用することができる。

【0013】本発明に用いる扁平上皮細胞は移植を行う器官の正常な上皮性組織から採取する。例えば、皮膚移植を行う場合、ヒト表皮細胞は、以下のような方法により得ることができる。すなわち、ヒト分層もしくは全層皮膚を無菌的に採取し、無菌の生理的食塩水にて洗浄する。これをディスパーゼ II（2,000 U/ml）にて37℃、20～40分処理することによりヒト表皮層を分離し、生理的食塩水で洗浄する。これをさらに0.25%程度のトリプシンにて37℃、5分処理し、血清添加培地中で攪拌して表皮細胞を分散する。分散した表皮細胞を $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 程度の密度で培養器に播種し、20%程度のFCSもしくはヒト血清加MEMalphaを用いて24時間培養する。その後培地を低カルシウム無血清培地（MCDB153）に置換し、1週間程度培養を続ける。以後、培養された表皮細胞をトリプシン処理によって剥離、継代し、低カルシウム無血清培地（MCDB153）を用いて望む細胞数が得られるまで増殖培養を行う。なお、他の扁平上皮細胞の場合にも、同様な方法によって扁平上皮細胞を得ることができ、例えば、口腔粘膜組織などは全く同様の方法で増殖培養することができる。また、上記のヒト表皮細胞培養は、特公昭57-18863号公報記載のように放射線照射した線維芽細胞もしくは線維芽細胞株との共培養によって行うことも可能である。

【0014】本発明に用いる線維芽細胞は扁平上皮細胞を得た上皮性組織に由来する線維芽細胞を使用する。これは移植後に移植された扁平上皮細胞が増殖し、正常な組織構造を形成し、また長期に生着するために必要なものであり、扁平上皮細胞を得た上皮性組織と異なる組織由来の線維芽細胞では、移植後の長期生着が困難となる傾向が見られる。一方、入手する線維芽細胞は自己のもので他人のものでもよく、同一の上皮性組織に由来するものであれば自家線維芽細胞でも同種線維芽細胞でも使用することができる。抗原性を考慮すれば自家細胞が好ましいが、同種細胞を用いた場合でも生着率の向上、正常な組織構造の再構築には問題がなく、同様の結果が得られる。同種線維芽細胞はHLA抗原の発現が弱く、比較的長期に生着することがその理由と考えられるが、炎症などともなってHLA抗原の発現が強くなることもあり得るため、また、患者が同種抗原に対して既に感作されていたり、抗体を持っていた場合、ただちに拒絶されて機能しない可能性もあるので、できれば自家細胞を用いることが好ましい。

【0015】このように、線維芽細胞は、移植された扁平上皮細胞が正常な組織に分化、増殖するために、その組織特有の何らかの情報を扁平上皮細胞に与えていると考えられるが、この情報がどのような因子であるかを同定するには至っていない。

【0016】皮膚移植の場合、ヒト表皮細胞に対してはヒト真皮由来の線維芽細胞を用いることになる。このヒ

ト真皮由来の線維芽細胞は、例えば、以下のような方法により得ることができる。ヒト分層もしくは全層皮膚を無菌的に採取し、無菌の生理的食塩水にて洗浄する。ディスパーゼ II (2,000 U/ml) にて37℃、20~40分処理することにより真皮層を分離し、生理的食塩水で洗浄する。これを細切後20%程度のFCSまたはヒト血清加MEM α 1 β 2 培地中にて約1週間培養し、増殖してきた線維芽細胞を継代培養する。なお、他の線維芽細胞も同じようにして、扁平上皮細胞を採取した組織由来の細胞から分離し増殖培養することができ、例えば、口腔粘膜、食道などの粘膜下組織も全く同じ方法で増殖培養することができる。

【0017】本発明に用いる凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンは、扁平上皮細胞と線維芽細胞とを担持もしくは包埋し、移植片が生着して皮膚組織が再現されるまでの間、移植片の一体性を保持するための基質として用いるものである。このような基質としては細胞を付着することができ、細胞および生体に無害であって、適当な弾性と保水性を有する物質であれば使用することができ、このようなものとして例えば、ゼラチン、コラーゲンなどがあげられる。しかし、本発明の移植片は、生体に移植した後に抗原性を示さず、また可及的速やかに分解、吸収されることが好ましく、この点から凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンが最も好ましい物質である。さらに、このような凝集ヒト血漿蛋白または凝集ヒトフィブリンで作製したシートは移植片として容易に取り扱うことができ、生体表面の創に固定できると同時に、移植後の組織においては扁平上皮細胞が体表面側に、線維芽細胞が組織側に整然と配列して正常な上皮性組織と同様な組織像を示す一方、フィブリンそのものは炎症を惹起することなく速やかに分解、吸収されて上皮性組織の完全な再生が図られるという点で好ましい結果が得られる。

【0018】また、フィブリンは患者本人の血液より調製することが可能であるため、必要に応じて、これを用いることによりすべてが自己由来の有機成分によって構成される移植片を作製することができる。現在フィブリンの滅菌法は種々報告されており、既知の感染症の危険はないが、自己フィブリンを用いることにより未知のものを含めて感染症伝播を完全に回避することができる。

【0019】シート状の凝集ヒト血漿蛋白またはフィブリンは、例えば、以下のような方法で作製することができる。自家血液をクエン酸ナトリウム (0.2%) もしくはACD液 (5% (V/V)) を加えて採取し、800×gにて20分間遠心してその上清 (すなわち、血漿) を得る。これを培養器に入れ、ヒトトロンビン (30 U/ml)、塩化カルシウム (2 mM) を加え、37℃にて数時間放置すると、凝集ヒト血漿蛋白シートが得られる。

【0020】また、ヒト血漿をそのまま使用せずに、血

漿にエタノールを加え、-4℃にて一晩放置した後遠心し、その沈渣を生理的食塩水に溶解したもの (いわゆるCohnの第一血漿分画でフィブリノーゲン、フィブロンネクチンなどを含む) を原料としてこれにカルシウム、トロンビンを作用させて調製した凝集ヒト血漿蛋白を用いてもよい。この場合にはフィブリノーゲン濃度を調整することができ、凝集シートの硬さ、移植後に分解される時間などを調節することも可能となる。さらに、これ以外の塩析法などの種々の方法で精製、滅菌したフィブリノーゲンをういたり、Cohnの第一血漿分画や精製フィブリノーゲンを一旦凍結乾燥させ、使用時に生理的食塩水に融解したものをういても同様のものが得られる。

【0021】凝集ヒト血漿蛋白またはフィブリンのシートを調製する際のフィブリノーゲンの濃度は、作製するシートの大きさや厚さ、シートを構成するゲル中のフィブリン量などに応じて適宜調整される。シートの分解、吸収性の点からみると、フィブリンの分解速度はシート中のフィブリンの濃度にも依存することから、移植に用いるにはシート作製時のフィブリノーゲン濃度を、概ね400~800 mg/dl程度とすることが好ましく、このような濃度のフィブリノーゲンをを用いる場合、シートの厚さを0.5~1 mm程度に調製すると、適度な硬さとフィブリン濃度を有するシートが得られ、シートの取扱い、移植後の生着性の点からも好ましい結果が得られる。

【0022】また、これらの凝集ヒト血漿蛋白あるいはフィブリンシート作製時に加えるカルシウムの濃度は2 mM以下が細胞に対する影響を少なくする上で望ましく、また、フィブリンシート作製時に、アプロチニン、ウリナスタチンなどの蛋白分解酵素阻害剤を添加しておくことにより、フィブリンの分解を適当に遅延させることができる。

【0023】

【発明の実施の形態】本発明の移植片は、フィブリンまたは凝集ヒト血漿蛋白から構成されたゲル状のシート中に線維芽細胞が分散された状態で存在し、シートの表面が扁平上皮細胞で覆われたものである。このような移植片は、フィブリンまたは凝集ヒト血漿蛋白に当該組織由来の線維芽細胞を包埋させ、表面に扁平上皮細胞を付着させることによって作製することができる。線維芽細胞の包埋はフィブリノーゲンを凝集させる際、線維芽細胞を共存させることにより行うことができ、フィブリノーゲンは線維芽細胞を取り囲むようにして凝集し、線維芽細胞が包埋されたフィブリンクロットまたはシートとなる。

【0024】例えば、皮膚移植用の植皮片の場合には、次のようにして作製する。すなわち、前述のフィブリノーゲンなどを含む溶液に真皮線維芽細胞を浮遊させ、真皮線維芽細胞が浮遊したフィブリノーゲン溶液を調製す

る。次いで、この溶液を培養器などに展開し、上記のようにトロンビンやカルシウムを添加し、フィブリノーゲンを凝集させ、線維芽細胞が包埋された凝集フィブリンシートを調製する。この時、後に移植片の剥離を容易にするため、培養器の底面に少量のヒトアルブミン溶液を滴下し、被覆しておくことは好ましい。線維芽細胞の包埋された凝集フィブリンシートの入った培養器に低カルシウム無血清培地(MCDB153)などを加えて37℃にて数時間放置し、凝集フィブリンシートを膨潤し、フィブリンクロットに含まれる水分を培地と置換する。その後、この凝集フィブリンシート上に上記のヒト表皮細胞播種し、細胞がフィブリン表面に付着するまで、さらに37℃にて3~24時間程度培養する。培養期間は1週間程度まで延長することができるが、あまり長期間培養すると基底部構造が破壊され、移植片の生着率を低下させる傾向が認められる。なお、移植後の感染予防のため、移植片作製時には抗生物質を含む培地を用いても良いが、この場合の抗生物質には細胞毒性の少ないもの、例えば500μg/mlのPIPC(ピペラシリン)などを用いることが好ましい。

【0025】ヒト表皮細胞を播種するときの細胞播種密度は、 $1\sim4\times10^5$ /cm² 位がよく、特に、 2×10^5 /cm² 程度が、生着率の点で、また、移植部範囲すべてを被覆できるという点で好ましい。また、表皮細胞と線維芽細胞との比率は1:2~2:1程度が、生着率の点で好ましい。また、ヒト表皮細胞を 5×10^4 /cm² 程度で播種し、そのままフィブリンシート上で48時間程度増殖培養しても同様の結果が得られる。

【0026】次いで、培養により細胞の付着したフィブリンシートをピンセットなどを用いて培養器から剥離し、移植片を得る。得られた移植片は、線維芽細胞が包埋されたフィブリンシート上に、表皮細胞がほぼ1~2層の状態が付着しているもので、各々の細胞密度は各細胞を播種後数時間では、播種時とほぼ同様の細胞密度を有している。播種後24~48時間培養したものでは各々の細胞密度は播種時よりも増加し、表皮細胞は数層からなる重層構造を呈している。これらの移植片はいずれもそのまま移植に用いることができ、また移植床の形状に応じて分割して用いることもできる。

【0027】また、他の扁平上皮細胞と線維芽細胞を用いて、同様な方法により移植片を作製することができる。例えば、口腔粘膜扁平上皮も線維芽細胞として粘膜下組織から同様の方法で培養したものを、全く同様の方法で移植片を作製することができる。

【0028】本発明における移植用細胞を包含、付着せしめた凝集フィブリンシートすなわち移植片の移植は、例えば以下のような方法で行うことができる。移植を行う組織欠損に対し、上記移植片を表皮細胞非付着面が創に向かうような方向で静置する。移植片が不安定であれば、フィブリンのり(例えば、ペリプラスト(商品名、

ベーリンガー社製)など)を創面に塗布して移植片を固定することも好ましい。この移植片の上から保湿性のよい被覆材を用いて被覆包帯を行う。被覆材には保湿性がよく、非接着性で細胞毒性のないものなどのようなものでも使用できるが、シリコーン膜(例えば、テガダーム(商品名、住友スリーエム社製)など)やワセリンガーゼなどが好ましい。この際ワセリンに細胞毒性のない抗生物質、例えば500μg/mlのPIPC(ピペラシリン)などを混入せしめておくことは感染防止上有効である。また、通気性2層性シリコーン膜(例えば、バイオペレン(商品名、日本バイリーン社製)など)なども使用することができるが、この場合ワセリン塗布などにより保湿性をよくし、創に接着しにくくしておくことが望ましい。基質として用いたフィブリンシートは、通常移植後3週間程度で分解、吸収されて組織から消失し、欠損部は移植した表皮細胞および線維芽細胞が増殖して、新たな皮膚組織が形成されて被覆される。

【0029】なお、フィブリンシートが溶解し消失するのは、タンパク分解酵素によるものであり、移植細胞を生着させ欠損部を完全に修復するためにシートをより長期間残しておく必要がある場合には、これらのタンパク分解酵素の作用を抑えるように、例えば、アプロチニン、ウリナスタチンのようなタンパク分解酵素抑制物質を添加したり、またシート作製時に高い濃度のフィブリノーゲンを用いることによって、シートが消失するまでの期間をある程度調整することができる。

【0030】また、本発明における移植用細胞の付着した移植片の移植は、はじめから組織欠損部に対して行うのではなく、次のように一度移植用細胞を体内で培養した後、移植部に移植する方法を採ることができる。これは、皮膚移植のように移植手術が比較的容易であり、移植結果が容易に確認できる部位以外の上皮性組織の移植に好適であり、このような例としては例えば、口蓋裂手術時の口腔粘膜の欠損充填時などの移植があげられる。具体的な方法としては、まず、移植する生体の皮膚を切開し剥離して、皮下にポケットを作製する。このポケット中に移植用細胞の付着した移植片を、挿入し、切開創を閉じる。なお、移植片を挿入するには、細胞付着面を体表面側でも体内側に向けて挿入してもよい。次いで、2~4週間後に再び皮膚を切開し、皮下に再現された移植細胞からなる皮膚あるいはその他の扁平上皮組織を切り離して、これを望む部位へ移植する。なお、皮下ポケット内に移植片を移植するときに、表皮細胞の付着した面にシリコーン膜などを置いておくと、移植片の変形、細胞の拡散を防止する上で好ましい結果が得られる。

【0031】上記の説明では、移植片としてシート状のものを例として説明したが、移植片の形状はシート状に限られるものではなく、必要に応じて、他の形状のものを使用することができる。このような形状の移植片はフィブリノーゲン溶液を凝集させる際に、フィブリノーゲ

ン溶液の量などをかえることにより調製することができる。

【0032】

【実施例】次に実験例によって本発明をさらに詳しく説明する。

【0033】実験例1

1. 移植片の作製

手術標本より得た皮膚から皮膚細胞の培養を行い、次のようにして移植片（移植用植皮片）を作製した。

【0034】分層皮膚を無菌的に採取し、無菌の生理的食塩水にて洗浄する。これをディスパーゼ II（2,000 U/ml）にて37℃、20～40分処理後表皮層を分離し、生理的食塩水で洗浄する。これをさらに0.25%トリプシンにて37℃、5分処理し、血清添加培地中で攪拌して表皮細胞を分散した。分散した表皮細胞を $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 程度の密度で培養器に播種し、20%ヒト血清加MEM- α 1phaを用いて24時間培養する。その後培地を低カルシウム無血清培地（MCDB153）に置換し、1週間程度培養を続けた。増殖してきた表皮細胞をトリプシン処理によって剥離、継代し、低カルシウム無血清培地（MCDB153）を用いて増殖培養を行い移植片の作製に用いた（表皮細胞）。

【0035】また、表皮層分離後の真皮層を生理的食塩水で洗浄し、これを細切後20%ヒト血清加MEM- α 1pha培地中にて約1週間培養し、増殖してきた線維芽細胞を3回継代培養した（真皮線維芽細胞）。これらの細胞は必要に応じて、20%ヒト血清、10%DMSO加MEM- α 1phaに浮遊し、プログラム凍結、液体窒素中に保存し、使用時に37℃の温水中にて急速解凍、それぞれの培地にて洗浄後短期間培養してから移植片作製に用いた。

【0036】新鮮凍結血漿（日赤社製）にエタノールを加え、-4℃にて一晩放置した後遠心し、その沈渣を生理的食塩水に溶解した（フィブリノーゲン量400mg

/dlの粗製フィブリノーゲン溶液）。培養した真皮線維芽細胞を微量の生理的食塩水に浮遊し、粗製フィブリノーゲン溶液と混合、充分攪拌した後これを培養器に入れ、ヒトトロニン（30U/ml）、塩化カルシウム（2mM）、PIPC（500 μ g/ml）、ウリナスタチン（5,000 U/ml）を加え、37℃にて数時間放置して、厚さ約1mmの、内部に真皮線維芽細胞が分散、包埋された移植用フィブリンシートを形成させた。これに前述の自家表皮細胞を $2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ の密度でMCDB153培地に浮遊したものを重層して12～18時間培養し、移植片を作製した。

【0037】2. 移植実験

次の方法により、本発明の移植片の生着性について検討した。まず、免疫不全マウス（balb-c nu/scid）の背部皮膚を直径1.5cmの大きさに全層切除し、切除後の筋膜上に上記移植片を移植し、非付着性包帯にて被覆した。次いで、経時的に移植部の肉眼的観察、組織学的検討を行った。

【0038】組織学的検討は、経時的に移植部皮膚を生検し、HE（ヘマトキシリン-エオシン）染色、HLAクラスIなどの免疫染色、および電子顕微鏡により組織学的検討を行い、移植片が生着したか否かの判断は、肉眼的に生着しているかまたはHLAクラスI陽性細胞が認められることを基準として行った。なお、HLAクラスI陽性細胞の確認は、免疫染色および遺伝子解析により行った。

【0039】3. 結果

対照試験として、表皮細胞のみをフィブリンシート表面に付着せしめ、線維芽細胞を含まない移植片、およびコラーゲンを基質として作製した複合型移植片を作製し、移植試験を行った。本願発明の移植片の結果を、これらの対照試験の結果とともに表1に示す。

【0040】

【表1】

	生着個体数/移植個体数 (%)		
	移植後1週	移植後3週	移植後6週
フィブリンを用いた移植片 表皮細胞および 真皮線維芽細胞	9/11 (82)	9/11 (82)	8/10 (80)
フィブリンを用いた移植片 表皮細胞のみ	1/3 (33)	1/3 (33)	0/3 (0)
コラーゲンを用いた移植片 表皮細胞および 真皮線維芽細胞	観察せず	8/13 (62)	7/13 (54)

20

表1によると、表皮細胞と真皮線維芽細胞とを付着した移植片を用いた場合、移植後の生着率は約80%であり、表皮細胞のみでは3週間以上の生着は認められなかった。これは、表皮細胞のみを移植すると、正常なヒト皮膚の構造が最初から形成されておらず、基底部構造も未熟で、その後に表皮萎縮が観察されたことから、自己再生、構造の維持が困難であったためと考えられる。従って本発明の移植片は、特開平04-45785号公報に従って作製された表皮細胞のみからなる移植片を移植した場合に比較して明かに優れた生着性を有していることがわかる。また、本発明の移植片の生着率はコラーゲンを基質とした複合型移植片の生着率よりも優れていた。これは、下記組織像に詳述するように、細胞とともに移植されたフィブリンは生体親和性がより高く、またより速やかに吸収され消失すること、従って、コラーゲンよりも炎症、感染を起こしにくいことなどがその理由のひとつとして考えられる。免疫反応の正常なヒトに移植した場合、この差異はさらに顕著となるであろうことは容易に推察できる。

【0041】再現された組織の肉眼的所見および組織像を図1および図2に示す。図1の(a)は再現された皮膚(移植3週間目)のHE(ヘマトキシリン-エオシン)染色像であるが、体表面には表皮細胞が重層構造を成しており、その内側に真皮様の結合組織が形成されている。表皮には基底層、有棘層、顆粒層、角質層がそれぞれ認められ、表皮肥厚を伴っているものの、正常皮膚と同様の組織構造を示している。表皮下に残存フィブリンと思われる無構造物が認められる。(b)は同じ標本のHLAクラスI染色であるが、表皮、真皮の細胞は共に陽性で、ヒト細胞により構成された皮膚であることがわ

かる。

【0042】図2は再現された皮膚(移植6週間目)の(a)HE(ヘマトキシリン-エオシン)染色像であるが、表皮は移植3週間目よりも薄くなり、正常皮膚に近い組織像を呈している。表皮下にフィブリンは認められず、吸収、消失したものと考えられる。IV型コラーゲン免疫染色(b)では、基底部(特に、表皮真皮接合部)に明瞭な局在染色性が認められ、また皮下結合組織には新生血管の内皮基底膜と思われる管腔構造に一致して局在染色性が認められる。

【0043】以上から、本移植片は、全く皮膚の要素を欠いたマウス筋膜組織上に、正常ヒト皮膚と同様の構造を持った皮膚を再現でき、また基質に用いたフィブリンは移植後3~6週間程度で吸収されることがわかる。

【0044】実施例2

1. 臨床成績

熱傷の臨床例において陳旧性の皮膚全層欠損創に対して本移植片の移植を行った。

【0045】78歳、男性。たき火が引火して、左下肢の全層性熱傷(体表面積の約10%)を負った。受傷約3週間後に創感染を来したため転院。創部皮膚を筋膜上まで全層切除、以後抗菌剤、抗生物質等により創傷処置を行った。

【0046】受傷約7週間後、全身麻酔下に左下肢外側の陳旧性肉芽に対しデブリードマンを行った後、創面にフィブリンのり(ペリプラスト(商品名、ペーリンガー社製))を塗布し、下記の方法にて作製した移植片(一枚75cm²)を10枚移植した。ペントシリン加ワセリン軟膏ガーゼにて被覆し、圧迫包帯を行った。移植5日後より経日的に創を肉眼的に観察し、移植組織の生検

50

を行って、組織学的検討を加えた。

【0047】2. 移植片の作製

患者大腿部より、 $3 \times 3 \text{ cm}$ の分層皮膚を無菌的に採取し、無菌の生理的食塩水にて洗浄。これをディスパーゼ II ($2,000 \text{ U/ml}$) にて 37°C 、 $20 \sim 40$ 分処理後表皮層を分離し、生理的食塩水で洗浄。さらに 0.25% トリプシンにて 37°C 、5 分処理し、血清添加培地中で攪拌して表皮細胞を分散した。分散した表皮細胞を $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ 程度の密度で培養器に播種し、 20% ヒト血清加 MEM-a l p h a を用いて 24 時間培養。その後培地を低カルシウム無血清培地 (MCDB153) に置換し、1 週間程度培養を続けた。増殖してきた表皮細胞をトリプシン処理によって剥離、継代し、低カルシウム無血清培地 (MCDB153) を用いて増殖培養を行い、移植片の作製に用いた (自家表皮細胞)。

【0048】また、表皮層分離後の真皮層を生理的食塩水で洗浄し、これを細切後 20% ヒト血清加 MEM-a l p h a 培地中にて約 1 週間培養し、増殖してきた線維芽細胞を 3 回継代培養した (真皮線維芽細胞)。これらの細胞は必要に応じて、 20% ヒト血清、 10% DMSO 加 MEM-a l p h a に浮遊し、プログラム凍結、液体窒素中に保存し、使用時に 37°C の温水中にて急速解凍、それぞれの培地にて洗浄後短期間培養してから移植片作製に用いた。

【0049】ACD 採血後遠心分離した自己血漿にエタノールを加え、 -4°C にて一晩放置した後遠心、その沈渣を生理的食塩水に溶解した (フィブリノーゲン量 400 mg/dl の粗製フィブリノーゲン溶液)。培養した真皮線維芽細胞を微量の生理的食塩水に浮遊し、粗製フィブリノーゲン溶液と混合、充分攪拌した後これを培養器に入れ、ヒトトロンビン (30 U/ml)、塩化カルシウム (2 mM)、PIPC ($500 \mu\text{g/ml}$)、アプロチニン (250 U/ml) を加え、 37°C にて数時間放置して、厚さ約 0.5 mm の、内部に真皮線維芽細胞が分散、包埋された移植用フィブリンシートを形成させた。これに MCDB153 培地に浮遊させた前述の自家表皮細胞を $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度で重層して 18 時間培養した。その後フィブリンシートを培養器から剥離し、移植片を培地中に浮遊せしめた状態にてさらに 4 時間培養してから移植に用いた。

【0050】3. 結果

移植部位には、移植 7 日目ごろより、肉眼的に皮膚と確認される構造が形成された。2 週間目までには創面積の

約 90% は再現された皮膚によって被覆されており、移植片の生着率は 90% 程度と考えられた。創は移植片からの上皮化により、移植 4 週間後には完全に閉鎖され治癒した。

【0051】創部に再現された皮膚の肉眼所見および組織像を図 3 および図 4 に示す。

【0052】図 3 は、移植前 (a) および移植後 11 日目 (b) の肉眼所見であるが、創面積の約 90% は移植後に再現された皮膚によって覆われている。

【0053】図 4 は、移植後 9 日目の組織像 (HE 染色像) であるが、表皮肥厚を伴ったヒト皮膚と同様の組織が認められる。表皮下、内に好中球を主体とした細胞浸潤を認めるが、組織構造は破壊されていない。

【0054】以上から、本移植片は皮膚全層欠損創に形成された肉芽組織上に移植した場合に、正常ヒト皮膚と同様の構造を持った皮膚組織を再現することが可能であることがわかる。また、高齢者の感染創に形成された陳旧性肉芽組織という悪条件の移植床に対しても高率に生着したことから、本移植片は従来の培養皮膚細胞からなる移植片と比較して、格段に優れた生着性を有することがわかる。

【0055】

【発明の効果】本発明によると、皮膚全層が欠損した創あるいは生体内の扁平上皮組織の創など体表面の創に対して、優れた生着率で皮膚やその他の扁平上皮組織を再現し、創を永久閉鎖することが可能な移植片が得られる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】移植 3 週間後の移植部位に再現された皮膚組織の組織像を示す図面代用写真であり、(a) は HE (ヘマトキシリン-エオシン) 染色像を、(b) HLA クラス I 抗原免疫染色像を示す。

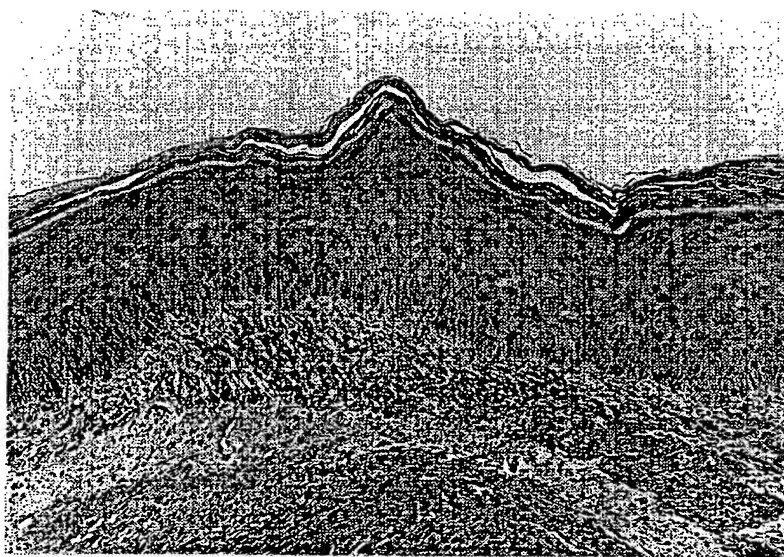
【図 2】移植 6 週間後の移植部位に再現された皮膚組織の組織像を示す図面代用写真であり、(a) は HE (ヘマトキシリン-エオシン) 染色像を、(b) は IV 型コラーゲン免疫染色像を示す。

【図 3】移植前 (a) および移植 11 日後 (b) の移植部位に再現された皮膚組織の肉眼的所見を示す図面代用写真である。

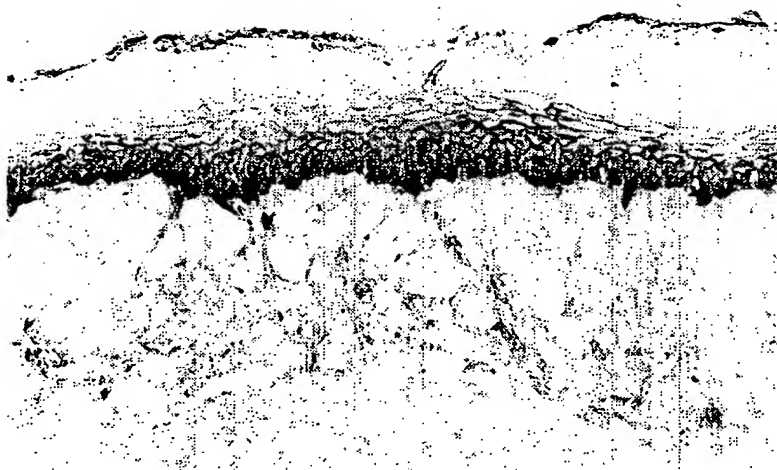
【図 4】移植 9 日後の移植部位に再現された皮膚組織の組織像を示す図面代用写真であり、HE (ヘマトキシリン-エオシン) 染色像である。

【図1】

(a)



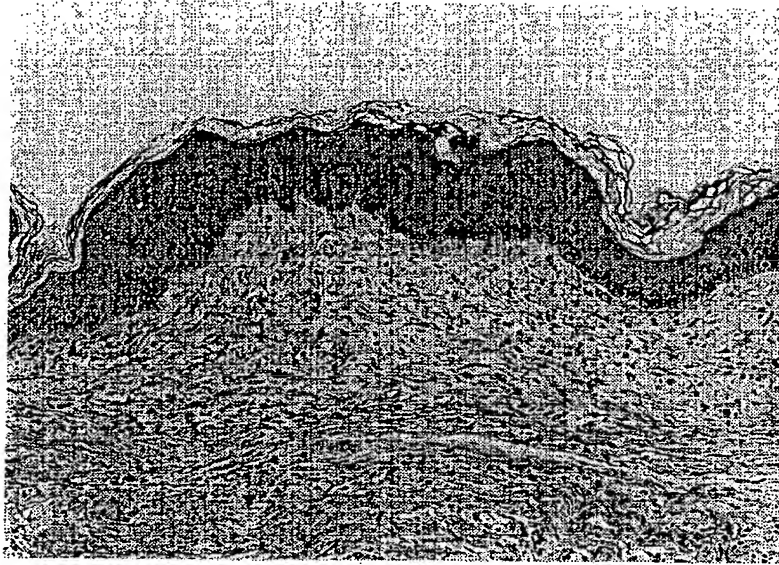
(b)



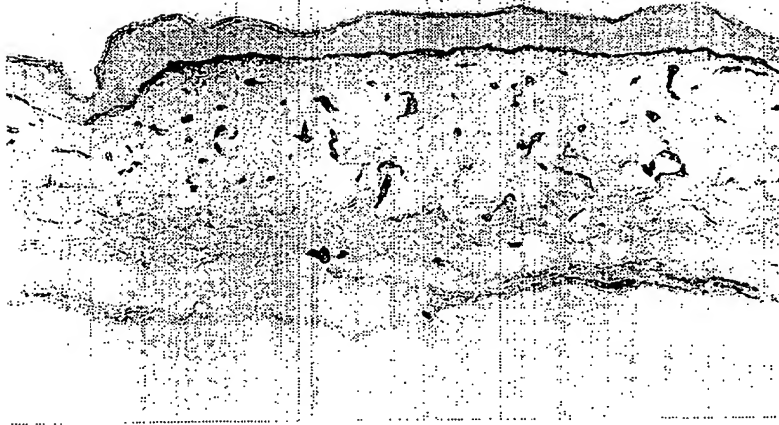
図面代用写真

【図2】

(a)



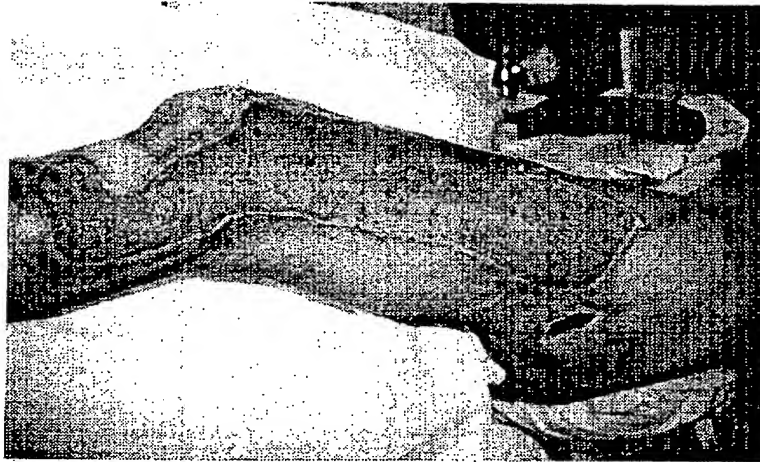
(b)



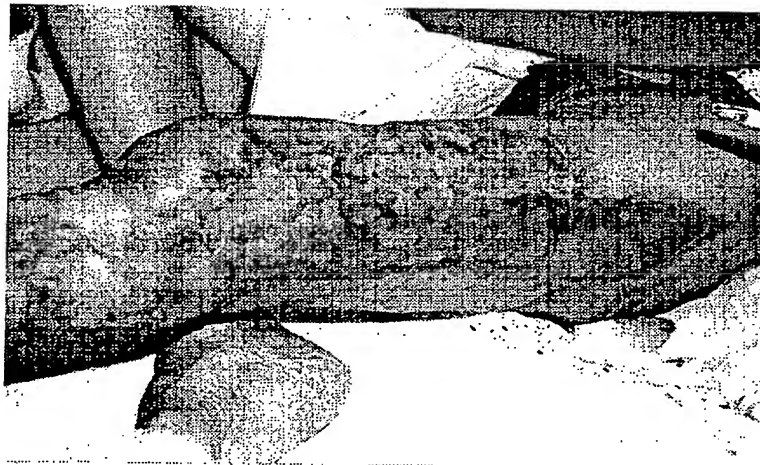
図面代用写真

【図3】

(a)

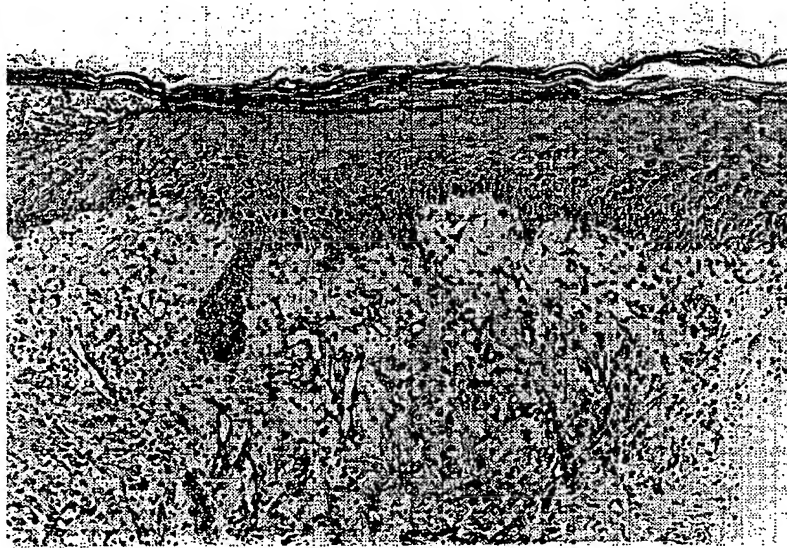


(b)



図面代用写真

【図4】



断面代用写真

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.